Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 1, Spring 2020, p. 103-112

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 12، شماره 1، بهار 1399، ص. 112-103

بررسی چند شکلی ژن پومس(پرواپیوملانوکورتین) و ارتباط آن با صفات رشد درجوجه‌های گوشتی

حجت جعفری زاده[1]، محمد باقر منتظر تربتی[2*]، سید همایون فرهنگ فر[3]

تاریخ دریافت : 1396/02/08
تاریخ پذیرش: 1398/03/21

چکیده

پرواپیوملانوکورتین (پومس) یک پروتئین پیش ساز در جوجه‌های گوشتی است که از 251 اسیدآمینه تشکیل شده است و در تنظیم غذای مصرفی و تعادل مصرف انرژی نقش دارد. هدف از انجام این پژوهش، تعیین چندشکلی ژن پرواپیوملانوکورتین و بررسی ارتباط آن با صفات رشد (که شامل وزن زنده، وزن لاشه، وزن سینه، وزن ران، وزن پشت وگردن، بال، کبد، قلب، بورس، طحال، پانکراس، پیش معده + سنگدان و چربی محوطه بطنی) در جوجه‌های گوشتی سویه راس وکاب بود. بدین منظور از تعداد 100 قطعه جوجه گوشتی سویه راس و 60 قطعه جوجه گوشتی سویه کاب نمونه خون تهیه و استخراج DNA به‌وسیله روش نمکی بهینه یافته صورت گرفت. پس از استخراج DNA، قطعه‌ای به اندازه 444bp از ناحیه اگزون دوم ژن پرواپیوملانوکورتین با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گردید. جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، از روش چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) و الکتروفورز محصولات تک رشته‌ای بر روی ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی توسط نیترات نقره انجام شد. برای ژن پرواپیوملانوکورتین در جوجه‌های گوشتی سویه راس دو الگو بنام E و F و در جمعیت جوجه‌های گوشتی سویه کاب نیز چهار الگوی A، B، C و D مشاهده شد. ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد به‌وسیله رویه‌ی GLM نرم افزار SAS آنالیز شد و نتایج نشان داد که در جوجه‌های گوشتی سویه راس و کاب، قطعه 444 جفت بازی ژن پرواپیوملانوکورتین در جایگاه اگزون دوم دارای چند شکلی است. و هیچ یک از الگوهای مشاهده شده در ناحیه مورد مطالعه از ژن پرواپیوملانوکورتین، در هیچ کدام از دو جمعیت ارتباط معنی‌داری با صفات رشد ندارند.

واژه های کلیدی: صفات رشد، ژن پرواپیوملانوکورتین، جوجه گوشتی، چندشکلی، PCR-SSCP.

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن 5 قبل از میلاد تا تقریبا قرن 7 میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (13). براساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به 3800 تا 3900 قبل از میلاد و 1000 قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به 1000 قبل از میلاد (13). از طرفی نیاز روز افزون جامعه به فرآوردهای پروتئینی با منشا حیوانی، استفاده از روش‌های نوین تولید و افزایش محصول را ضروری کرده است. در میان این فرآورده‌ها، گوشت مرغ در تغذیه بشر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل در چند دهه گذشته تولید گوشت مرغ در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران رشد روز افزونی داشته است و پیش بینی می‌شود که در آینده نیز ادامه یابد. برای افزایش تولید عمودی علاوه بر روش‌های نوین مدیریت،

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام- دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند.
2- دکترای زیست شناسی سلولی مولکولی، استادیار بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند
3- دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، استاد بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند
(*-نویسنده مسئول: Email: montazer.torbati@birjand.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i1.64015

بهداشت و تغذیه، استفاده از روش‌های علمی اصلاح نـژاد بـه همـراه تکنیک‌های مولکولی ضروری می‌باشد. در صنعت اصلاح نـژاد طیـور میزان رشد به دلیل ارزش اقتصادی‌اش یکی از مهمترین زمینـه‌هـای پژوهش می باشد، و به شکل چشمگیری در گذشته از طریق انتخاب براساس توده بدنی که وراثت متوسط به بالا را نوید می‌دهـد، بهبـود یافته است. بنابراین ممکن اسـت کـه بـا بـه کـارگیری نشـانگرهای ژنتیکی جهت ارزیابی مستقیم ژنوم برای حذف آلل های ناخواسـته و افزایش درجه هموزیگوتی یا هتروزیگوتی برای آلل‌های مطلوب قدم‌های اساسـی در جهـت بهبـود ژنتیکـی در طیـور برداشـت (5 و 6). همچنین در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکـی باشـد .روش‌هـای مولکـولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (1). به علاوه، استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگـاه خاصـی است (15) همچنـین اسـتفاده از نشـانگرهای ژنتیکـی در انتخـاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکـی را تسریع کند (8). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بـومی بـرای حفاظت از منابع ژنتیکـی ذخـایر بـومی لازم و ضـروری اسـت (12). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خـاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهـای بـــومی و محلـــی بســـیار اهمیـــت دارد (21 و 25). اهمیـــت پرواپیوملانوکورتین (پومس) (POMC[1]) در رابطه با اشتها، به عنوان یک ژن کاندید مهم برای چاقی در انسان و صفات مربوط بـه لاشـه شناخته شده است. نقش ژن POMC و پپتیدهای مشتق شـده از آن در تنظیم غذای مصرفی برای اولین بار با بررسی بر روی دو کـودک که نقـص‌هـایی در ژن POMC داشـتند مشـخص گردیـد (24). در پژوهشی که بر روی موش‌هـا انجـام گرفتـه، نقـش ژن POMC در تنظیم خوراک مصرفی و وزن بدن بـه اثبـات رسـیده اسـت(24). ژن پرواپیوملانوکورتین (پومس) یک پروهورمون را رمزگذاری می‌کند که در سطوح معناداری از سه گروه مجزا از سلول‌های عصبی لایه پهـن اکتودرمال بیان می‌شود که در هریک از سلول‌های درون‌ریز هیپوفیز یا نورون‌های مغز توسعه می‌یابد (18). سلول‌های خاص پس از فرآیند ترجمه پروهورمون پومس، پپتیدهای فعـال بیولـوژیکی گونـاگونی را تولید می‌کند که در پستانداران در پاسخ به تنش‌ها نقش غیرمستقیمی را ایفا می‌کند (17). ژن پومس در طیور برای اولین بار از ژنـوم مـرغ جداسازی شده و مشخص گردید که ژنوم مرغ‌ها تنها یـک نسـخه از ژن پومس را دارا می‌باشند. مقدار زیادی از mRNA ژن پومس مـرغ در مغز، فوق کلیه، تخمدان، و بافت چربی کشف شده است. اما، میزان بیان mRNA ژن پـومس در هیپوتـالاموس براسـاس سـن و گونـه متفـاوت اسـت (2). ژن پـومس در مـرغ 251 آمینواسـید پـروتئین را کدگذاری کرده، و همچنین توالی آن با 817 جفت باز جداسازی شده است. در جوجه گوشتی ژن پومس بر روی کروموزوم 3 قرار داشـته و شامل 756 نوکلئوتید و 2 اگزون مـی‌باشـد (16). اینتـرون آن از GT شروع و به AG خاتمه می‌یابد. تمامی ژن‌های پومس کشف شده در سایر گونه‌ها شامل سه اگزون می‌باشـد و تمـامی اطلاعـات ژنـومی DNA برای ژن پومس همگی در اگزون سوم می‌باشد (22). اینترون ژن پومس در مرغ در مقایسه با سایر گونه‌ها از نظـر انـدازه کـوچکتر است. با توجه به تحقیقات انجام شده به اثبات رسیده که بافـت‌هـای بیان کننده ژن پومس در واقع بیان کننده گیرنده‌های ملانوکورتین در مرغ می‌باشند و به گونه‌ای که اشاره شد عمل ملانوکورتین‌ها به شیوه پاراکرین و یا اتوکرین برخی از اعمال این بافت‌ها را در مرغ‌ها کنترل می‌کند (22). در پژوهشی که شارما و همکـاران (20)، بـر روی چنـد شکلی ژن پرواپیوملانوکورتین بر روی جوجه‌های تجاری با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام دادند پس از مشـاهده چندشـکلی‌هـای بدست آمده هیچ گونه ارتباط معناداری بین چندشکلی‌ها بـا رانـدمان مصرف خوراک در هیچ یک از دو جنس (نر و ماده) مشاهده نکردنـد (20). اگر چه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (10، 11، 14، 19، 26)، اما تا کنون در رابطه با چندشـکلی ژن پومس در جوجه های گوشتی سویه‌های راس و کاب مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، هدف از انجام این تحقیق، شناسایی چند شـکلی در ناحیه اگزون دوم ژن پومس در جمعیت جوجه های گوشتی سویه‌های راس و کاب با استفاده از روش تفاوت آرایش فرم فضایی رشته‌هـای منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP) و ارتبـاط آن با صفات رشد و ترکیبات لاشه می‌باشد.

مواد و روش ها

تعداد 160 قطعه جوجه گوشتی مورد مطالعه که به طور تصـادفی از محل پرورش که همگی در سن 6 هفتگی انتخاب شده بودند، جمع آوری شد. و وزن بدن در پایان 6 هفتگی (زمان کشتار) اندازه گیـری شده و همه جوجه‌ها کشتار و پس از تجزیه لاشه، صـفات وزن کـل لاشه بدون محتویات شکمی، وزن پشت بدن (گردن، سینه و محوطه لگنی)، وزن عضله سینه، وزن عضله ران، وزن و درصد چربـی حفـره بطنی اندازه گیری و ثبت گردیدند. در زمان کشتار، از تمام جوجه‌ها به مقدار 6 میلی لیتر خون گرفته شد و برای جلوگیری از انعقـاد نمونـه‌های خون از EDTA استفاده و نمونه‌هـا تـا زمـان اسـتخراج DNA

1- Pro-Opiomelanocortin(POMC)

ژنومی در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی انجام گردید (7). سپس کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر-نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید.

دراین پژوهش برای بررسی چندشکلی ژن پومس از یک جفت آغازگر براساس توالی ژنومی موجود در جوجه برای تکثیر اگزون دوم ژن پومس استفاده شد.، آغازگرهای مورد نظر از چینش ثبت شده با شماره دسترسی AB019555 ژن پومس مرغ از بانک ژن استفاده شد. این آغازگرها یک قطعه 444 جفت بازی را از ناحیه اگزون دوم ژن پومس را تکثیر می‌نمایند.

PomcF: 5'-GAGGTCTTCCCTAAGCTGACTG-3'
PomcR: 5'-CATCTCCCTCCGGAACTCCAT-3'

واکنش PCR با استفاده از کیت Master PCR (Cinnagen, Iran) و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز به حجم نهایی 25 میکرولیتر که ترکیب آن عبارت است از: 0/2 میکرولیترآنزیم Taq پلیمراز (**باغلظت**1U/reaction)، 0/5میکرولیتراز هرdNTP (با غلظت 10mM)، 1/25 میکرولیتر MgCl2(با غلظت2/5mM)، 1میکرولیتر پرایمر رفت با غلظت 10 پیکومول، 1میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت 10 پیکومول، 1میکرولیتر DNA (با غلظت 100نانوگرم)، 2/5 میکرولیتر بافر PCR(10X) و در نهایت 17/4 میکرولیتر از آب دیونیزه استفاده کردیم تا حجم نهایی به 25 میکرولیتر برسد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته سازی، 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و سپس مرحله اصلی تکثیر به تعداد 35 مرحله دمایی در دستگاه ترموسایکلر که شامل مرحله واسرشته سازی در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای 58 درجه سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت و در پایان یک مرحله گسترش نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز 1 درصد با ولتاژ 80 ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. قطعه تکثیرشده با اشعه ماوارابنفش(UV) عکسبرداری و مشاهده شد.

برای تجزیه محصولات PCR به کمک روش SSCP از ژل آکریل آمید استفاده شد. برای این منظور 4 میکرولیتر از محصول PCR با 4 میکرولیتر SSCP- dye (شامل 9/5 میلی لیتر فرمامید+400 میکرولیترEDTA نیم مولار+0/03 گرم بروموفنل بلو 10 درصد) و نیز 3 میکرولیتر گلیسرول مخلوط گردید و به مدت 10 دقیقه در ترموسایکلر با دمای 94 درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از بهم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به‌عمل آید. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید 10 درصد با ولتاژ 200 و به مدت 8 ساعت جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. بعد از پایان الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید با استفاده از نیترات نقره جهت دیدن چندشکلی‌های ایجاد شده رنگ آمیزی شد (3).

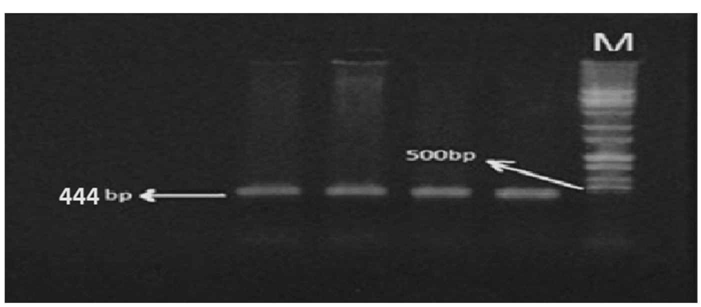
برای برآورد فراوانی الگوها از نرم افزار POPGEN نسخه 31 استفاده گردید (4). اطلاعات بدست آمده با استفاده از مدل آماری زیر و با روش GLM در نرم افزار آماریSAS آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + b\,(W_i\text{-}W) + e_{ijk}$$

در این مدل؛ Y_{ijk}:ارزش فنوتیپی صفات مورد مطالعه، μ، میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات و e_{ijk}:اثر باقی مانده می‌باشد. عوامل جنس(S_i) و ژنوتیپ(G_j) به عنوان اثرات ثابت و $b(W_i\text{-}W)$ به عنوان ضرایب رگرسیون وزن اندام‌ها به کوواریت وزن زنده یا وزن لاشه (آنالیز اندام‌ها) در مدل وارد گردیدند.

نتایج و بحث

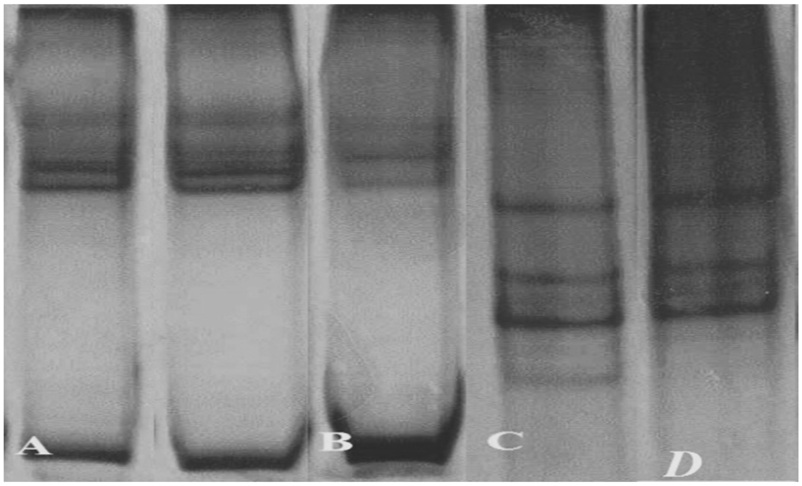
کیفیت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با الکتروفورز ژل آگارز 1% با مارکر 100 جفت باز سنجیده شد، که نتایج الکتروفورز محصولات در اگزون دوم ژن پومس در شکل (1) مشاهده می‌شود.



شکل1- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1 درصد

Figure 1- Electrophoresis of PCR products on 1% agarose gel

همان‌طور که در شکل 1 مشاهده می‌شود قطعـه مـورد نظـر بـه درستی تکثیر شده و اندازه باند در تمام نمونـه‌هـا یکسـان اسـت. بـا استفاده از نشانگر SSCP، از نتایج الکتروفورز محصولات تکثیر شـده قطعه444 جفت بازی ژن پومس در جوجه‌های گوشـتی سـویه کـاب چهار الگوی باندی متفاوت مشاهده شد، که این چهار الگو با حـروف A، B، C و D نامگذاری شده‌اند (شکل 2).



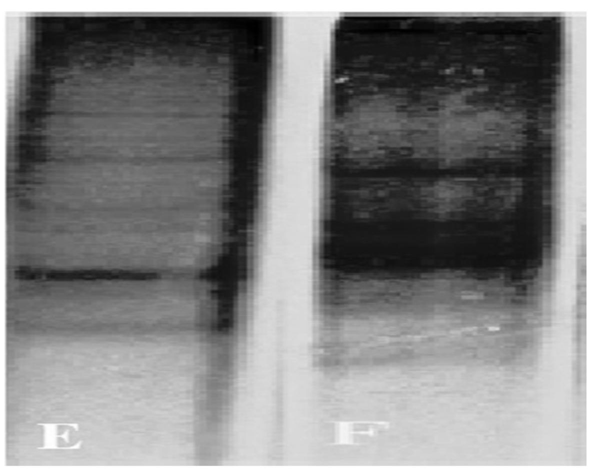
شکل 2- الگوهای باندی ژن پومس جوجه‌های گوشتی سویه کاب، حاصل از ژل آکریل‌آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

Figure 2- Band patterns of Pomc gene in Cobb broiler, obtained from acrylamide gel and stained with silver nitrate

در جوجه‌های گوشتی سویه راس همانند جوجه‌های گوشتی سویه کاب از نشانگر SSCP استفاده شد. که نتایج الکتروفورز محصـولات تکثیر شده قطعه444 جفت بازی ژن پومس بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در جوجه‌های گوشتی سویه راس دو الگوی باندی متفاوت نشان داد، که این دو الگو با حروف E وF نامگذاری شدند (شکل 3).

فراوانی الگوها در درون جمعیت‌ها و هم بین جمعیت‌هـا توسـط نرم افزار PopGene32 صورت گرفت که در جـدول (1) آورده شـده است.

نتایج این تحقیق در ارتباط با سویه کاب با نتایج بای و همکاران (2)، که بر روی چند شکلی ژن پومس در جوجه‌های گوشـتی انجـام دادند مطابقت داشت زیـرا در تحقیـق بـای و همکـاران کـه بـرروی (اگزون 1 و 2) انجام شده بود دو نوکلئوتید C و T و سه نوع ژنوتیپ CC، CT و TT شناسایی شده است، که ژنوتیپ‌های شناسایی شده با صفات مرتبط با رشد یعنی میزان عمق سینه در 12 هفتگی، عرض لگن در 4 هفتگی و همچنین وزن بدن در 2 هفتگی ارتباط معنی‌داری داشته است (2).



شکل 3- الگوهای باندی ژن پومس جوجه‌های گوشتی سویه راس، حاصل از ژل آکریل‌آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره

Figure 3- Band patterns of Pomc gene in Ross broiler, obtained from acrylamide gel and stained with silver nitrate

جدول 1- فراوانی الگوها در دو جمعیت و بین جمعیت‌ها

Table 1- Frequency of patterns in two populations and between populations

patterns الگوها	Cobb	Ross	Ross&Cobb
A	0.6286	0	0.3099
B	0.0857	0	0.0423
C	0.1429	0	0.0704
D	0.1429	0	0.0704
E	0	0.5556	0.2817
F	0	0.4444	0.2254

در تحقیق دیگری نیز که بر روی چند شکلی ژن پرواپیوملانوکورتین بر روی اگزون سوم دو نژاد گوسفند با استفاده از روش RFLP انجام دادند دو نوکلئوتید C و T و سه نوع ژنوتیپ CT،CC و TT شناسایی شده بود که با نتایج SSCP محصولات PCR ژن پومس در جایگاه اگزون دو جوجه‌های گوشتی سویه‌های راس و کاب از نظر چند شکلی‌های بدست آمده مطابقت داشت (23).

ارتباط چندشکلی ژن پرواپیوملانوکورتین(پومس) با صفات رشد

رابطه بین الگوهای مشاهده شده در ژن پرواپیوملانوکورتین با صفات رشد در جوجه‌های گوشتی سویه راس و کاب مورد آزمون قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که الگوهای مشاهده شده در سطح قطعه 444 جفت بازی تکثیر شده از اگزون دوم ژن پرواپیوملانوکورتین در هر دو سویه اثر معنی‌داری بر روی صفات رشد و صفت وزن بدن نداشت.

آنالیز آماری مربوط به اثر معنی‌داری الگوهای ژن پرواپیوملانوکورتین بر صفات رشد در جوجه‌های گوشتی سویه کاب و سویه راس در جدول (2 و 3) نشان داده شده است.

جدول2- حداقل میانگین و خطای استاندارد صفات رشد براساس الگوهای ژن پومس در جوجه‌های گوشتی سویه کاب

Table 2- Minimum mean and standard error based on growth traits in broilers Cobb Pomc gene patterns

صفات Traits	A	B	C	D	P-Value
وزن زنده Live weight	1812.3±50.7	1943.06 ±133.5	1905.83±101.09	1865.83±101.09	0.6881 ns
وزن لاشه Carcass weight	1602.1±46.22	1706.66±121.73	1681.99±92.16	1621.99±92.16	0.7586 ns
وزن سینه Breast weight	400.13±10.95	432.3±28.84	449.38±21.84	411.38±21.84	0.1929 ns
وزن ران thigh weight	345.15±10.24	388.63±26.98	371.72±20.43	355.51±20.43	0.3447 ns
پشت + گردن Back + Neck	334.60±12.86	361.12±33.86	348.67±25.64	344.60±25.64	0.8535 ns
بال Wing	134.82±4.07	142.33±10.71	142.93±8.11	134.67±8.11	0.7441 ns
کبد Liver	54.92±2.03	53.62±5.36	55.76±4.06	55.85±4.06	0.9836 ns
قلب Heart	10.6±0.36	11.46±0.96	10.92±0.73	11.23±0.73	0.7462 ns
بورس Bursa	1.15±0.07	1.55±0.2	1.13±0.15	1.19±0.15	0.3253 ns
طحال Spleen	2.24±0.16	1.99±0.44	2.38±0.33	2.09±0.33	0.8643 ns
پانکراس Pancreas	5.04±0.19	4.5±0.5	4.7±0.38	4.96±0.38	0.6838 ns
پیش معده + سنگدان Proventriculus+Gizzard	43.9±1.87	49.2±4.95	46.11±3.74	42.06±3.74	0.63 ns
چربی محوطه بطنی Abdominal fat	20.99±1.9	23.52±5.02	20.73±3.8	16.06±3.8	0.5888 ns

ns: non-significant

ns: عدم وجود رابطه معنی‌دار

جدول3- حداقل میانگین و خطای استاندارد صفات رشد براساس الگوهای ژن پومس در جوجه‌های گوشتی سویه راس

Table 3- Minimum mean and standard error based on growth traits in broilers Ross Pomc gene patterns

صفات Traits	E	F	P-Value
وزن زنده Live weight	2349.25±61.55	2555.93±68.81	0.0618 ns
وزن لاشه Carcass weight	1618.65±43.19	1786.81±48.29	0.0546 ns
وزن سینه Breast weight	549.25±19.52	605.93±21.82	0.0612 ns
وزن ران thigh weight	478.8±11.74	519.56±13.12	0.0768 ns
پشت + گردن Back + Neck	403.4±15.64	475.06±17.48	0.0938 ns
بال Wing	172.2±3.81	183.5±4.26	0.0565 ns
کبد Liver	58.48±2.36	64.04±2.64	0.1261 ns
قلب Heart	14.75±0.512	14.81±0.57	0.9419 ns
بورس Bursa	3.96±0.27	4.77±0.31	0.06 ns
طحال Spleen	2.71±0.202	2.54±0.22	0.5713 ns
پانکراس Pancreas	5.77±0.308	6.61±0.34	0.0781 ns
پیش معده + سنگدان Proventriculus+Gizzard	46.11±1.51	48.24±1.68	0.3549 ns
چربی محوطه بطنی Abdominal fat	31.38±1.93	33.97±2.15	0.3758 ns

ns: عدم وجود رابطه معنی‌دار

ns: non-significant

علاوه بر این محققان چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی متفاوتی را در ژن پرواپیوملانوکورتین کشف کرده‌اند که برخی از چند شکلی‌ها با صفات مرتبط به رشد و وزن ارتباط دارند. در پژوهشی که لئو یانگ و همکاران (9)، در رابطه با چند شکلی پرولپیوملانوکورتین و ارتباط آن با صفات مرتبط با تولید گوشت انجام دادند به این نتیجه رسیدند که چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در اگزون سوم ژن پرواپیوملانوکورتین گاوهای چینی ارتباط معنی‌داری با ضخامت چربی پشت و ماهیچه ناحیه کمر داشتند (9). همچنین در تحقیق دیگری که با استفاده از روش PCR-SSCP بر روی چندشکلی ژن پرواپیوملانوکورتین و ارتباط آن با صفات رشد بر روی گاوهای نژاد نانیانگ انجام شد، سه چندشکلی تک نوکلئوتیدی و دو ژنوتیپ AA و BB در اگزون سوم ژن پرواپیوملانوکورتین گاوی مشاهده نمودند که وزن بدن در شش ماهگی و میزان افزایش وزن روزانه در گاوهای با ژنوتیپ BB از ژنوتیپ AA بیشتر بود (27). همچنین در پژوهشی که بر روی چندشکلی ژن پرواپیوملانوکورتین و ارتباط آن با صفات رشد بر روی اگزون سوم این ژن در دو نژاد گوسفند چینی با استفاده از روش RFLP انجام شده است، سه ژنوتیپ TT، TC، TT را در نژاد HU و دو ژنوتیپ TT، TC را در دو رگه Friesian× HU مشاهده نمودند. بررسی‌ها نشان داد که اگزون سوم ژن پرواپیوملانوکورتین گوسفند با صفات رشد ارتباط داشته و آلل C با صفات افزایش وزن بدن و اندازه بدن گوسفند ارتباط داشته است (23). اما در پژوهشی که شارما و همکاران (20)، بر روی چند شکلی ژن پرواپیوملانوکورتین بر روی جوجه‌های تجاری با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام دادند پس از مقایسه توالی‌های بدست آمده با توالی ژن پرواپیوملانوکورتین مرغی، شاهد دوازده چندشکلی تک نوکلئوتیدی و یک تغییر دو نوکلئوتیدی بودند که شش چندشکلی تک نوکلئوتیدی و یک تغییر دو نوکلئوتیدی در اینترون یک و شش چندشکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون دوم مشخص شد، پس از مشاهده چندشکلی‌های بدست آمده هیچ گونه ارتباط معناداری بین چندشکلی‌ها با راندمان مصرف خوراک در هیچ یک از دو جنس (نر-

ومـاده) مشـاهده نکردنـد (20). بـا توجـه بـه نقـش مهـم ژن پرواپیوملانوکورتین در اعمال فیزیولوژیکی بدن و تاثیر هورمون‌هـای مشتق شده از پرواپیوملانوکورتین بر رشد غدد فـوق کلیـوی و تولیـد هورمون‌های استروئیدی، پخش و توزیع دانه‌هـای ملانـین ، قـدرت یادگیری، تنظیم حرارت بدن، فشار خون، فعالیت‌های جنسی و تنظیم انرژی هومئوستازی و میزان خوراک مصرفی در انسان و دام شناخت جنبه‌های ژنتیکی آن در پیشبرد برنامـه‌هـای اصـلاح نـژاد و بهبـود تولیـدات دامـی بـا اهمیـت اسـت. مطالعـات زیـادی روی ژن پرواپیوملانوکورتین و ارتباط آن بـا صـفات مختلـف در انسـان و دام انجـام شـده اسـت. مطالعـه درمـورد تشـخیص چندشـکلی‌هـای ژن پرواپیوملانوکورتین و ارتباط آن با صفات مختلف اقتصادی در گونه‌های اهلی (گاو، گوسفند، طیور) در سال‌های اخیر مورد توجه محققین اصلاح نژاد دام قرار گرفته و انجام شده اسـت، چـرا کـه ایـن ژن در بسیاری از صفات اثر معنی داری را از خود نشان داده‌انـد (24). البتـه نتایج بدست آمده در مطالعات صورت گرفتـه بـرروی جمعیـت‌هـای گونه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است بـه همـین دلیـل نیـاز بـه مطالعات بیشتری در مورد این ژن می‌باشد تا بتوان در آینده نزدیک از نتایج تحقیقات به‌عمل آمده در برنامه‌های اصـلاح‌نـژادی و انتخـاب استفاده نمود. اعتقاد براین است که پرواپیوملانوکـورتین عمـده‌تـرین کنترل کننده اشتها، متابولیسم انرژی، بلوغ، باروری، ایمنی و افزایش وزن بدن است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به شرایط موجود به نظر می‌رسد جوجه‌هایی که دارای دو الگوی B و F بودند ضریب تبدیل غذایی بـالاتری نسـبت بـه سـایر الگوها داشته و به همین نسـبت دو الگـوی فـوق دارای وزن چربـی شکمی بالاتری نسبت به سایر الگوها می‌باشند. علاوه بر موارد فـوق جوجه‌های دارای دو الگوی B وF دارای وزن اعمـا و احشـا کمتـری نسبت به سایر الگوها بوده و این مورد در زمان کشتار یک مزیت مهم تلقی شده که میزان افت وزن کشتار را به حـداقل رسـانده و از نظـر اقتصادی برای تولید کننده امری مهم بشمار آمده و میزان سوددهی را بیشتر می‌نماید از این‌رو به نظر می‌رسد انتخاب جوجه‌هایی که دارای دو الگوی فوق باشند به منظور والدین نسل بعد از نظر اقتصـادی بـه صرفه تر بوده و توجیه پذیرتر می‌باشد.

منابع

1. Alinaghizadeh, H., M.R. Mohammad Abadi, and S. Zakizadeh. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez Red Goat. Journal of Agricultural Biotechnology, 2 (1): 69-80. (In Persian).
2. Bai, Y., G. Sun., X. Kang., R. Han., Y. Tian., H. Li, and S. Zhu. 2012. Polymorphisms of the pro-opiomelanocortin and agouti-related protein genes and their association with chicken production traits. Journal of *Molecular biology*, *39*(7): 7533-7539.
3. Benbouza, H., M. Jacquemin., J. Baudoin, and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable fast cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. Journal of Biotechnology Agronomy Society and Environment, 10: 77-81.
4. Cary, N.C. SAS Institute Inc. version 9.1.3: Administrator Guide for SAS 9.1.3 Foundation for Microsoft Windows 2003.
5. Dunnington, E.A., O. Gal, and Y. Plotsky. 1990. DNA fingerprints of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. Journal of Animal Genetics, 21: 247-257.
6.Gu, Z., D. Zhu., N. Li., H. Li., X. Deng, and C. Wu. 2004. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Journal of Science in China Life Science, 47: 26-31.
7. Iranpur, V, and M. A. K. Esmailizadeh. 2010. Rapid Extraction of High-Quality DNA from Whole Blood Stored at 4ºC for Long Period. Protocol Online. http://www.protocol-online.org.
8. Javanmard, A., M.R. Mohammadabadi., G.E. Zarrigabayi., A.A. Gharahedaghi., M.R. Nassiry., A. Javadmansh, and N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus). Russian Journal of Genetics, 44 (4): 495-497.
9. Liu, Y., L. Zan., L. Li, and Y. Xin. 2013. Proopiomelanocortin gene polymorphisms and its association with meat quality traits by ultrasound measurement in Chinese cattle. Journal of Research Gate Gene, *529*(1): 138-143.
10. Moazeni, S., M.R. Mohammadabadi., M. Sadeghi., H. Shahrbabak., A. Koshkoieh, and F. Bordbar. 2016. Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Journal of Animal Sciences, 6 (1): 1-8.
11. Moazeni, S.M., M.R. Mohammadabadi., M. Sadeghi., H. Moradi Shahrbabak, and A.K. Esmailizadeh. 2016. Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Journal of Livestock Science and Technologies, 4 (2): 51-56.
12. Mohammadi, A., M.R. Nassiry., J. Mosafer., M.R. Mohammadabadi,and G.E. Sulimova. 2009. Distribution of

BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos indicus). Russian journal of genetics, 45(2): 198-202.
13. Mohammadabadi, M.R., M. Nikbakhti., H. R. Mirzaee., A. Shandi., D. A. Saghi., M.N. Romanov, and I. G. Moiseyeva. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian journal of genetics, 46 (4)*: 505-509.
14. Mohammadifar, A, and M.R. Mohammadabadi. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. Iranian journal of Animal Science, 42(4): 337-344. (In Persian).
15. Mousavizadeh, A., M.R. Mohammad Abadi., A. Torabi., M. R. Nassiry., H. Ghiasi, and A.K. Esmailizadeh. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology, 7 (1): 51-53.
16. Pavlidis, H. O. 2006. Do Gene Polymorphisms Associated with Feed Efficiency Influence Production Traits and Ascites Incidence in Broiler Crosses. ProQuest Information and Learning Company, 157-160.
17. Raffin-Sanson, M. L., Y. DeKeyzer, and X. Bertagna. 2003. Proopiomelanocortin a polypeptide precursor with multiple functions from physiology to pathological conditions. European Journal of Endocrinology, *149*(2): 79-90.
18. Scully, K. M, and M. G. Rosenfeld. 2002. Pituitary development regulatory codes in mammalian organogenesis. Journal of Science Animal, *295*(5563): 2231-2235.
19. Shahdadnejad, N., M.R. Mohammadabadi, and M. Shamsadini. 2016. Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Journal of Genetics in the 3rd millennium, 14 (4): 4368-4374.
20. Sharma, P., W. Bottje, and R. Okimoto. 2008. Polymorphisms in uncoupling protein, melanocortin 3 receptor, melanocortin 4 receptor, and pro-opiomelanocortin genes and association with production traits in a commercial broiler line. Journal of Poultry Science, *87*(10): 2073-2086.
21. Shojaei, M., M.R. Mohammad Abadi., M. Asadi Fozi., O. Dayani., A. Khezri, and M. Akhondi. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research, 2: 67-73.
22. Takeuchi, S., K. Teshigawara, and S. Takahashi. 1999. Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. Journal of Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research, 1450 (3): 452-459.
23. Wang, C. L., C. L. Meng., S. X. Cao., J. Zhang., C. H. Meng., H. L. Wang, and D. G. Mao. 2013. Single nuclear polymorphisms in exon 3 of POMC gene and the association with growth traits in Hu sheep and East Friesian x Hu crossbred sheep. journal of Yi chuan Hereditas Zhongguo yi chuan xue hui bian, *35*(9):1095-1100.
24. Yang, Y. K, and C. M. Harmon.2003. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. Journal of Obesity reviews, 4 (4): 239-248.
25. Zamani, P., M. Akhondi., M.R. Mohammadabadi., A.A. Saki., A. Ershadi., M.H. Banabazi, and A.R. Abdolmohammadi. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10: 1812-1817.
26. Zandi, E., M.R. Mohammadabadi., M. Ezzatkhah, and A.K. Esmailizadeh. 2014. Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 509-514. (In Persian).
27. Zhang, C. L., Y. H. Wang., H. Chen., C. Z. Lei., X. T. Fang., J. Q. Wang, and J. Xiao. 2009. The polymorphism of bovine POMC gene and its association with the growth traits of Nanyang cattle. journal of Yi chuan Hereditas Zhongguo yi chuan xue hui bian, 31(12): 1221-1225.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 12, No. 1, Spring 2020, p. 103-112

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 12، شماره 1، بهار 1399، ص. 112-103

Study of *POMC* (Pro-Opiomelanocortin) Gene Polymorphism and its Association with Growth Traits of Broiler Chicks

H. Jafarizadeh[1]- M. B. Montazertorbati[2*] - S. H. Farhangfar[3]
Received: 28-04-2017
Accepted: 11-06-2019

Introduction: The central melanocortin system appears to be an important mediator of the actions of both leptin and insulin, which are key elements in the control of energy balance. Proopiomelanocortin (POMC) is a complex precursor protein that is proteolytically cleaved to a variety of biologically active and important neuroendocrine peptides. The POMC gene is expressed mainly in the anterior and intermediate lobes of the pituitary and in the arcuate nucleus of the hypothalamus, and at a lower level also in a wide variety of peripheral tissues and of brain regions in mammals. It produces many biologically active peptides via a series of enzymatic steps in tissue-specific manners, which have important roles in the regulation of appetite, sexual behavior, the movement of melanin produced from melanocytes in skin and the production of endogenous opioid peptides with widespread actions in the brain. In chicken, the POMC gene consisted of three exons and two introns and its protein has 251 amino acid residues with nine proteolytic cleavage sites, suggesting that it could be processed to give rise to all members of the melanocortin family, including adrenocorticotropic hormone and alpha-, beta- and gamma-melanocyte-stimulating hormones, as well as the other POMC-derived peptides. Considerable evidence has been collected indicating that POMC mutations are associated with obesity.

Materials and method: Blood samples were collected in EDTA vials from one hundred Ross and sixty Cobb broiler chicks, stored at -20 and their DNA was extracted using the modified salting-out chloroform method. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out by specific primer pairs to amplify a 444bp fragment from a part of exon two of the Pro-Opiomelanocortin gene. The pattern of all samples was determined through single stranded conformation polymorphism (SSCP) analyses by Acrylamide gel using silver nitrate staining. The associations between polymorphisms (patterns) and the growth traits (live and carcass weight, and the weight of breast, thigh, back and neck, wings, liver, heart, bursa of Fabricius, pancreas, paraventricular, gizzard and spleen) were evaluated using the GLM procedure of the SAS software.

Results and Discussion: The extraction or genomic DNA and amplification of 444bp fragment of Pro-Opiomelanocortin gene were successfully done and it was polymorph in both strains. Two different patterns were found in Ross strain, E and F patterns with the frequencies of 0.56 and 0.44, respectively. Four different patterns were found in Cobb strain, A, B, C and D patterns with the frequencies of 0.63, 0.09, 0.14 and 0.14, respectively. There was no significant association between the patterns and the growth traits. In Ross strain, the effect of genotype (pattern) tend o be significant for carcass weight (p value = 0.054) and the chickens with F pattern have more carcass weight than those with pattern E. In Cobb strain, chickens with B pattern tend to have better slaughter yields compared to other patterns. Our results revealed that Cobb strain has more diversity in the studied fragment of POMC gene than Ross strain.

Conclusion: Energy homeostasis and body weight (BW) are regulated by coordinated actions of multiple genes. For significant economically traits, improvements in BW can be achieved through mass selection whereas feed conversion is relatively more difficult to improve. Gene polymorphisms can be used for improvement of the production traits by genetic selection, if the allelic association with the traits be determined. The variable associations of the identified polymorphisms may be a result of the differences in the population characteristics, sex, or both, indicating that the selection criteria may influence the production trait associations. This should be

---

1- MSc graduated student in genetics and animal breeding- Faculty of Agriculture, University of Birjand.
2- Assistant Professor in molecular and cellular biology, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand
3-Professor in genetics and Animal breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand
(*- Corresponding Author Email: montazer.torbati@birjand.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v12i1.64015

taken into consideration while selecting for the desired production traits. Additional studies are required to expand the genetic and physiological aspects involved in feed intake, digestion, and metabolism. The genomic diversity also has important implications in the evolutionary dynamics of species. Investigations of polymorphisms are useful for better understanding of the gene function, and those associated with commercially significant production traits have a potential for usage as molecular markers for selection programs. In summary, the identified polymorphisms and their associations with the traits of economic importance in the present study provides greater insight into the role POMC gene involved in energy balance in poultry and points toward the potential application of the findings for the enhancement of production traits by marker assisted selection.

Keywords: Broiler chicks, Growth traits, PCR-SSCP, Polymorphism**,** Pro-Opiomelanocortin gene.